

(21) 99127744/04

(13) A

(22) Dec. 28, 1999

(51) 7 C 07 H 21/00, G 01 N 33/50, C 08 F 220/56

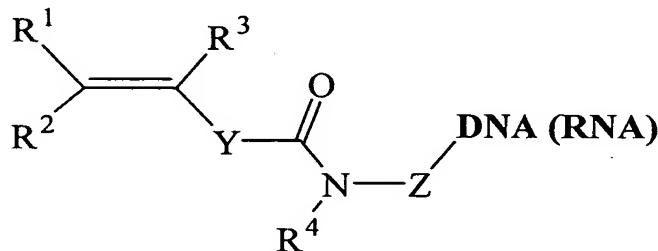
(72) A. D. Mirzabekov, A. Yu. Rubina, S. V. Pan'kov, B. K. Chernov

(71) V.A. Engel'gardt Institute of Molecular Biology, RAN

Mailing address for correspondence: 103735, Moscow, Il'inka str. 5/2, OOO "Soyuzpatent", A.P. Agureev

(54) A METHOD FOR IMMOBILIZATION OF OLIGONUCLEOTIDES COMPRISING UNSATURATED GROUPS IN POLYMER HYDROGELS ON FORMATION OF MICROCHIP

(57) 1. A method for immobilization of oligonucleotides in polymer hydrogels comprising a copolymerization of modified oligonucleotides with unsaturated monomers on formation of polymer gels, *characterizing in that* a high extent of immobilization is achieved by modification of oligonucleotides with unsaturated groups of general formula (I)



wherein:

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> are H, alkyl C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, Ph, PhCH<sub>2</sub>;

Y is (p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub> where n = 0-2;

R<sup>4</sup> represents H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH where n = 2-6;

Z is (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(CH<sub>2</sub>OH)CH<sub>2</sub>OX where n = 1-6; or -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OX where n = 2-6;

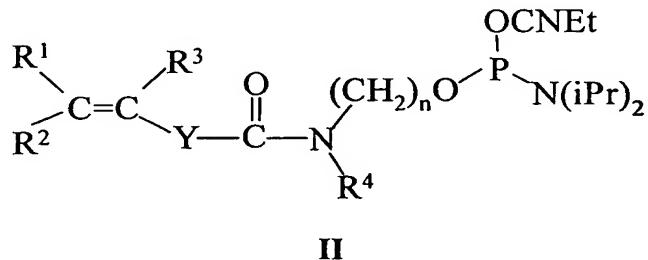
X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide,

having a high ability to copolymerization with the monomer forming the basis of hydrogel obtained.

2. A method of claim 1, *characterizing in that* polymeric hydrogel is a polyacrylamide gel as obtained by copolymerization of unsaturated acrylamide and bis-acrylamide monomers or any other monomers on their basis.

3. A method of claim 1 *characterizing in that* a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed in automatic conditions.

4. A method of claim 3 *characterizing in that* a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed by using corresponding phosphoramidite of general formula (II):



wherein

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> are H, alkyl C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, Ph, PhCH<sub>2</sub>-; where n = 2-6;  
 R<sup>3</sup> is alkyl C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

$R^4$  represents H,  $(CH_2)_n$ -ODMT where  $n = 2-6$ ;

Y is  $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$  where n = 0-2,

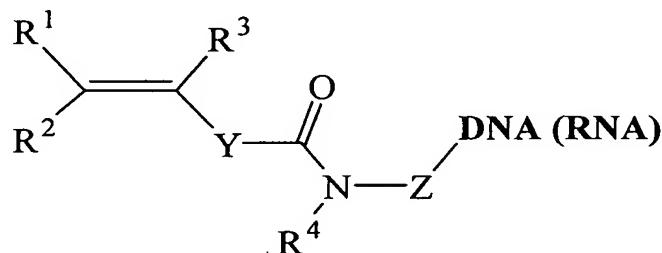
and a bond type of phosphor with said unsaturated group being of P-O.

5. A method of claim 1 characterizing in that a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed in post-automatic conditions.
6. A method of claim 5 characterizing in that a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed by acylation of the amino-linker comprising oligonucleotide with activated ester of unsaturated acid.
7. A method of claim 6 characterizing in that an activated ester of unsaturated acid represents 4-nitrophenyl ester.
8. A method of claims 3 and 5 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed at 5'-end of oligonucleotide.
9. A method of claims 3 and 5 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed at 3'-end of oligonucleotide.
10. A method of claim 1 characterizing in that an immobilization is performed by photo-copolymerization under exposure of UV radiation.
11. A method of claim 10 characterizing in that a photo-copolymerization is performed by a droplet method using an application of droplets onto previously modified glass.
12. A method of claim 11 characterizing in that an application of droplets is performed by using a micro syringe.
13. A method of claim 12 characterizing in that a volume of droplets is about 0.2  $\mu$ L.

14. A method of claim 11 characterizing in that an application of droplets is carried out using an automatic robot for applying micro droplets.

15. A method of claim 14 characterizing in that a volume of droplets is about 1 nanoL.

16. An oligonucleotide modified with unsaturated groups of general formula (I)



wherein:

$R^1, R^2, R^3$  are H, alkyl  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2-$ ;

$Y$  is  $(p-C_6H_4)_n$  where  $n = 0-2$ ;

$R^4$  represents H,  $(CH_2)_nOH$  where  $n = 2-6$ ;

$Z$  is  $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$  where  $n = 1-6$ ; or  $-(CH_2)_n-OX$  where  $n = 2-6$ ;

$X$  is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide,

17. An oligonucleotide of claim 16 characterizing in that modification with an unsaturated group is performed at 5'-end of oligonucleotide.

18. An oligonucleotide of claim 16 characterizing in that modification with an unsaturated group is performed at 3'-end of oligonucleotide.

BEST AVAILABLE COPY

# ИЗОБРЕТЕНИЯ ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ

ИЗДАЕТСЯ С 1924 ГОДА  
ВЫХОДИТ ТРИ РАЗА В МЕСЯЦ

(43) Сведения о заявках, помещенные в настоящем  
бюллетене, считаются опубликованными 10.09.2001

(46) Сведения о патентах на изобретения и  
свидетельствах на полезные модели, помещенные в  
настоящем бюллетене, считаются зарегистрированными  
и опубликованными 10.09.2001

ФОНД ЭКСПЕРТОВ

11 СЕН 2001

ФИПС

25 (1 ч.)

2001

ФИПС  
МОСКВА



10. Способ по п.1, отличающийся тем, что иммобилизацию осуществляют путем фотосополимеризации под действием УФ-излучения.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что фотосополимеризацию проводят капельным способом путем нанесения капель на предварительно модифицированное стекло.

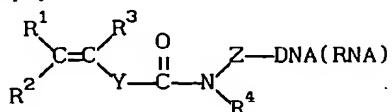
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что нанесение капель осуществляют с помощью микрошиприца.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что объем капель составляет около 0,2 мкл.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что нанесение капель осуществляют с помощью автоматического робота для нанесения микрокапель.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что объем капель составляет около 1 нл.

16. Олигонуклеотид, модифицированный непредельными группами общей формулы [I]



где  $R^1, R^2, R^3$  - H, алкил  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2$ ;

$Z = (CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2O\bar{X}$ , где  $n = 1-6$ ; или  $(CH_2)_n-O\bar{X}$ , где  $n = 2-6$ ;

$X$  - фосфодиэфирная группа, связывающая непредельный фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида;

$R^4$  - H,  $(CH_2)_nOH$ , где  $n = 2-6$ ;

$Y = (p-C_6H_4)_n$ , где  $n = 0-2$ .

17. Олигонуклеотид по п.16, отличающийся тем, что он модифицирован непредельной группой по 5'-концу.

18. Олигонуклеотид по п.16, отличающийся тем, что он модифицирован непредельной группой по 3'-концу.

добавления или делеции, произведенные в данном пептиде, при том, что данные замены, добавления или делеции приводят к получению пептида, способного нейтрализовать или модулировать образование антимиелинового основного белка.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного компонента пептид с формулой: Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr; включая замены, добавления или делеции, произведенные в данном пептиде, при том, что данные замены, добавления или делеции приводят к получению пептида, способного нейтрализовать или модулировать образование антимиелинового основного белка, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

3. Способ лечения рассеянного склероза у больного, отличающийся введением данному больному эффективного количества пептида с формулой: Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr; включая замены, добавления или делеции, произведенные в данном пептиде, при том, что данные замены, добавления или делеции приводят к получению пептида, способного нейтрализовать или модулировать образование антимиелинового основного белка, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

4. Способ лечения рассеянного склероза у больного, отличающийся введением данному больному эффективного количества пептида с формулой:



и его солей, при том, что  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбраны из группы, включающей водород, гидроксил, аминокислотный остаток и полипептидный остаток; при том, что  $R_1$  и  $R_2$  не являются одновременно водородом или гидроксилом; включая замены, добавления или делеции, произведенные в данном пептиде, при том, что данные замены, добавления или делеции приводят к получению пептида, который сам по себе или в сочетаниях способен нейтрализовать или модулировать образование антимиелинового основного белка, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем; при этом указанный способ предусматривает введение последовательных доз указанного пептида.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является Asp-Pro-Val-, а  $R_2$  является водородом или гидроксилом.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является Pro-Val-, а  $R_2$  - Val.

7. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является Pro-Val-, а  $R_2$  - Val-Thr.

8. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является водородом или гидроксилом, а  $R_2$  - Val-Thr-Pro.

9. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является Lys-Ser-His-Gly-Arg-Thr-Gln-Asp-Glu-Asn-Pro-Val, а  $R_2$  - Val-Thr.

10. Способ по п.4, отличающийся тем, что  $R_1$  является Asp-Glu-Asn-Pro-Val-, а  $R_2$  - Val-Thr-Pro-Arg-Thr.

11. Способ по п.4, отличающийся тем, что пептид вводят внутривенно, оболочечно или обоими способами.

12. Способ по п.11 отличающийся тем, что пептид вводят внутривенно, лежащей в пределах 1 - 10 мг/тела.

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что пептид вводят внутривенно, дозе, лежащей в пределах 1 - 10 мг/тела.

14. Способ по п.11 отличающийся тем, что пептид вводят ежедневно в четырех или пяти дней.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что спустя примерно одну неделю первой инъекции вводят дополнительную дозу пептида.

## C 08

(21) 99122954/04

(22) 03.04.1998

(51) 7 С 07 К 14/47, А 61 К 31/17, А 61 Р 9/10

(31) 2,201,841 (32) 04.04.1997 (33) СА

(85) 04.11.1999

(86) РСТ/СА 98/00290 (03.04.1998)

(87) РСТ/WO 98/45327 (15.10.1998)

(72) УОРРЕН Кеннет Г. (СА), КЭТЦ

Ингрид (СА)

(71) ЗЕ ГОВЕРНОРС ОФ ЗЕ ЮНИ-

ВЕРСИТИ ОФ АЛБЕРТА (СА)

(74) Дементьев Владимир Николаевич

Адрес для переписки: 119034, Москва,

Пречистенский переулок, д.14, строение

1, 4 этаж, "Гоулингз Интернэшнл Инк.",

Дементьеву В.Н.

(54) ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ОС-

НОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА, ФАР-

МАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

НА ИХ ОСНОВЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

ДАННЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕ-

НИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

(57) 1. Пептид с формулой: Asp Glu Asn

Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val

Thr Pro Arg Thr; включая замены,

добавления или делеции, произведенные

в данном пептиде, при том, что данные

замены, добавления или делеции приво-

дят к получению пептида, способного

нейтрализовать или модулировать обра-

зование антимиелинового основного бел-

ка, в смеси с фармацевтически приемлемым

носителем.

2. Компонент катализатора, отличающийся тем, что количество

ленового полимера меньше, чем 1

г твердого компонента катализатора.

3. Компонент катализатора, отличающийся тем, что количество

ленового полимера меньше, чем 5

г твердого компонента катализатора.

4. Компонент катализатора, отличающийся тем, что твердый

компонент катализатора содержит со-

нитана, имеющее по меньшей мере

10% алюминия, Ti, Mg, Ti-галоген, и

электронодонорное соединение